Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie
Kommissarischer Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen

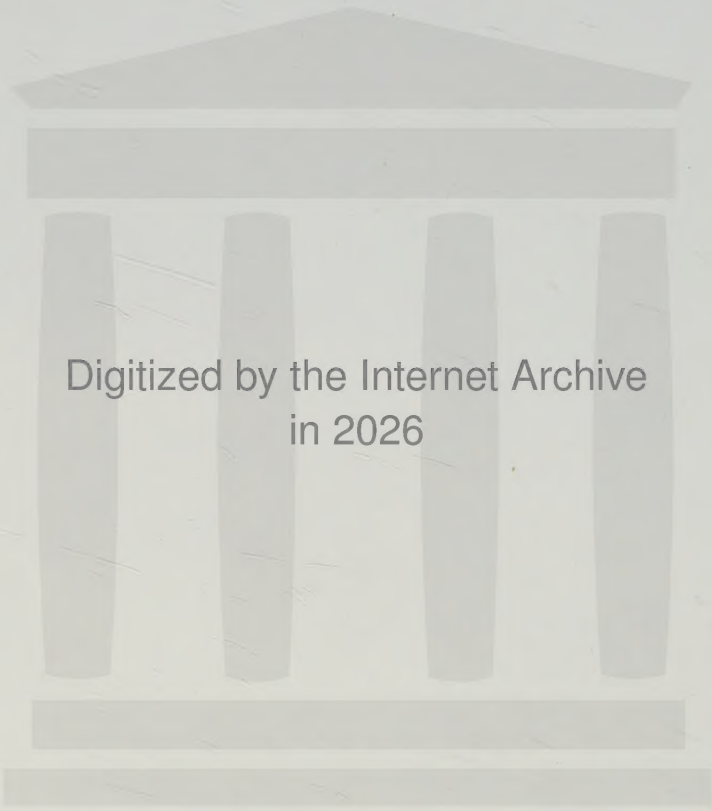
ELEKTROPHORESE–MOBILITÄTS–TEST (EMT): IMMUNOLOGISCHE TUMORDIAGNOSE VERSUCHE ÜBER DEN WIRKUNGSMECHANISMUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ENGELBERT LAIER
aus Reutlingen

1978


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0070

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie
Kommissarischer Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen

ELEKTROPHORESE–MOBILITÄTS–TEST (EMT): IMMUNOLOGISCHE TUMORDIAGNOSE VERSUCHE ÜBER DEN WIRKUNGSMECHANISMUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ENGELBERT LAIER
aus Reutlingen

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.- E. Hoffmeister

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Riethmüller

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. D. Waller

Gedruckt bei Hans-Joachim Köhler, Reprografischer Betrieb, 74 Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG.....1
MATERIAL UND METHODE.....3
Patientengut.....3
Lymphocytenisolierung.....3
Gesunde Personen.....4
Nicht-maligne Erkrankungen.....5
Maligne Erkrankungen.....6
Übersichtsabbildung.....8
Organlokalisation der Malignome.....9
Abweichendes EMT-Ergebnis.....10
Antigen.....11
Indikatorpartikel.....11
Testansatz.....11
O-Standard.....11
Messung der elektrophoret. Mobilität.....11
Ergebnisse.....13
Schema des Testes.....15
Zytopherometer-Abbildung.....16
ERGEBNISSE.....17
Kinetik der Mediatorproduktion.....17
Verschiedene Lymphocytenkonzentrationen.....20
Verschiedene MSF-Konzentrationen.....22
Erhitzen des mediatorhalt. Überstandes.....24
Versuche mit leukocytenreichem Überstand.....26
B-Zell-Anreicherung.....28
T-Zell-Anreicherung.....31
PHA-Stimulierung.....34
Makrophagen-Elimination.....35
ETS-Waschungen.....37
10 x Waschen der Lymphocyten.....39
DISKUSSION.....41
LITERATUR.....49

1. EINLEITUNG

Caspary und Field entwickelten den Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts (MEM)-Test zum Nachweis zellulär vermittelter Immunphänomene. Es wird angenommen, dass sensibilisierte Lymphocyten in Gegenwart eines homologen Antigens Lymphokine beziehungsweise Faktoren abgegeben, welche als Mediatorsubstanzen der zellulären Immunreaktion wirken (Abb. 3). Bekannt ist der "migration inhibition factor" (MIF), welcher in vitro die Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen, Monocyten und polymorphkernigen Leukocyten hemmt, ohne ihre sonstigen Zellfunktionen einzuschränken (Dumonde et al., 13 und Weir et al., 43). Caspary und Field (14) beschrieben nun einen ähnlichen "Faktor", den "macrophage slowing factor" (MSF), welcher von sensibilisierten Lymphocyten nach Stimulation durch ein basisches Myelinprotein aus menschlichem Gehirn abgegeben wird. Dadurch wird die Beweglichkeit von Indikatorzellen im elektrischen Feld des Cytopherometers infolge einer Reduktion der negativen elektrischen Oberflächenladung der Makrophagenmembran verlangsamt. Fast alle malignen Tumoren des Menschen sollen basische Proteine ("determinante Gruppen") besitzen, die Ähnlichkeiten mit dem basischen Myelinprotein ("encephalitogener Faktor" = EF) aufweisen (Caspary et al. (8), Dickinson et al. (11), Irmscher et al. (20)). Wichtig scheint die Tryptophanregion zu sein (Carnegie et al., 3). Als Antigen kann auch ein aus Tumorgewebe gewonnenes basisches Protein ("cancer basic protein" = Ca.B.P.) eingesetzt werden (Carnegie et al. (4), Caspary, E. A. (5), Dickinson et al. (12), Field et al. (15), Grossmann u. Mitarb. (19), Müller u. Mitarb. (28)).

Die Verwendung von Meerschweinchenmakrophagen als Indikatorzellen erscheint problematisch; die Gewinnung ist methodisch relativ aufwendig. Es können nur gesunde, in-

fektfreie Tiere herangezogen werden. Die aus der Peritonealhöhle des Meerschweinchen nach Stimulation mit Paraffinöl gewonnenen Zellen stellen keine homogene Population dar, vielmehr handelt es sich um ein Gemisch aus Makrophagen, Granulocyten und Lymphocyten. Die dabei erhaltenen Makrophagen weisen grosse Unterschiede in Grösse und Zahl der pro Zelle phagocytierten Öltröpfchen auf, so dass nur eine Makrophagenpopulation mit einer definierten Grösse und einer bestimmten Zahl von Öltröpfchen zur Messung herangezogen werden kann, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen (Shenton et al., 42).

Von Porzsolt et al. (33 und 34) wurde eine wesentliche Vereinfachung des Tests eingeführt, indem sie statt Meerschweinchenmakrophagen tannierte und sulfosalicylsäurestabilisierte Hammelerythrocyten (ETS) verwendeten. Diese homogenen Zellen sind relativ einfach zu präparieren, leicht zu lagern und jederzeit in beliebiger Menge verfügbar. Im folgenden wurde mit dieser Modifikation gearbeitet.

Gegenstand der Arbeit sind Fragestellungen zum Wirkungsmechanismus des EM-Testes. Dabei soll zunächst auf die gewonnenen Ergebnisse an einem größeren Kollektiv von Patienten mit malignen und nicht malignen Erkrankungen sowie von gesunden Kontrollpersonen eingegangen und so dann die einzelnen Versuchsansätze beschrieben werden, die unternommen wurden, um zu einer Aussage über die den Mediator produzierenden Zellen sowie deren Zuordnung zu verschiedenen Lymphocytenpopulationen zu kommen.

Der besseren Übersicht wegen wurden die Ergebnisse der jeweiligen Versuchsansätze gleich im Anschluß an die Beschreibung der Methodik angeführt.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1.Patientengut.

Es wurden 20 Normalpersonen, 22 Patienten mit nicht malignen Erkrankungen und 42 Patienten mit malignen Erkrankungen untersucht.
Bei den malignen Erkrankungen wurde das Blut in 20 Fällen präoperativ entnommen, in 22 Fällen postoperativ.
Die Malignomdiagnosen waren alle histologisch gesichert.

2.2 Lymphocytenisolierung.

20 ml heparinisiertes Venen-Blut (100 I.E. Heparin) wurde mit 2 ml Dextran (Macrodex 6%) versetzt, um dadurch eine schnellere Sedimentation der Erythrozyten zu bewirken. Nachdem das Blut 60 Min. bei 37°C inkubiert wurde, ist der leukocytenreiche Überstand ("buffy coat") auf 15 ml Ficoll (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) geschichtet und für 35 Min. bei 250 g zentrifugiert (= Gradienten-Zentrifugation) worden. Die spezifisch schwereren Erythrocyten und Granulocyten wurden dadurch sedimentiert, die mononukleären Zellen sammelten sich zwischen Ficoll und Plasma in der Interphase (Perper et al., 31). Durch die spezifische Dichte der Ficoll-Lösung (1,076 bis 1,078) wurde gewährleistet, daß die für den Test wichtigen Lymphocyten gewonnen wurden (Minderhoud et al., 27). Nach dreimaligem Waschen in Hanks balanced salt solution (HBSS) wurden die Lymphocyten in RPMI-Medium ohne Serumzusatz resuspendiert und auf 5×10^6 Zellen/ml RPMI eingestellt.
Die Kontamination mit Granulocyten betrug maximal 15%, mit Monocyten 5%.
Der Trypanblau-Test zeigte nach 24 Stunden noch durchschnittlich 95% vitale Lymphocyten.

GESUNDE PERSONEN

No.	Name	Alter	Geschlecht	%-Hemmung
1	Lai	23	w	8
2	Lai	26	m	7
3	Goe	49	m	4
4	Aic	25	w	3
5	Div	35	w	3
6	Woi	32	m	2
7	Scu	36	m	2
8	Kla	27	w	2
9	Sce	23	w	1
10	Feu	28	m	0
11	Sca	17	m	0
12	Tau	33	m	-1
13	Dur	39	m	-1
14	Rap	18	m	-1
15	Kae	27	m	-2
16	Keg	14	m	-2
17	Fin	32	w	-3
18	Swi	36	w	-4
19	Scw	36	m	-5
20	Kla	27	m	-5

Tab.1 Die Ergebnisse der Migrationen bei 20 Normalpersonen.

NICHT-MALIGNE ERKRANKUNGEN

No.	Name	Alter	Geschl.	Diagnose	%-Hemmung
1	Han	62	m	Durchblutungsstörung im li. Hirnstamm nach Commotio cerebri	27
2	Scu	50	w	Radiculitis nach Zeckenbiss	16
3	Ass	15	w	Appendicitis 5 Tage postop.	11
4	Ajd	6	m	akute Glomerulo-Nephritis	11
5	Use	26	w	Sprunggelenksfraktur offen	9
6	Ste	16	m	Purpura Schoenlein-Henoch	9
7	Jun	21	w	Sprunggelenksfraktur offen	8
8	Pan	38	m	Sprunggelenksfraktur offen	8
9	Zie	33	m	Skrotalabszess	8
10	Buc	32	m	Magenulcus 14 Tage postop.	7
11	Tra	10	m	Coxitis fugax	5
12	Mol	28	m	Osteomyelitis	5
13	Sce	42	m	Nierencyste	5
14	Pap	29	w	Blasenwand-Fistel	4
15	Klo	34	m	Sek. Hyperparathyreoidismus	4
16	Kra	37	m	Coxarthrose	3
17	Hai	37	m	Bandscheiben-Prolaps	2
18	Lin	69	m	Kehlkopf-Perichondritis	2
19	Har	13	w	Osteomyelitis	1
20	Leh	58	w	Postmenopausenblutung	0
21	Her	79	w	Glaukom	-1
22	Sca	8	m	Allergisches Asthma	-5

Tab.2 Die Migrationen bei 22 nicht-malignen Erkrankungen.

MALIGNE ERKRANKUNGEN

No.	Name	Alter	Geschl.	Diagnose	%-Hemmung
1	Den	73	m	Sigma-Neoplasma 5 Tage postop.	39
2	Vas	36	w	Mamma-Ca praeop.	38
3	Hip	58	m	Larynx-Ca (Platten-epithel) 11 Tge. postop.	36
4	Bau	82	m	Larynx-Ca 4 Monate postop.	28
5	Pfe	54	m	Larynx-Ca 2 Jahre postop.	28
6	Blu	45	m	M. Hodgkin+Hoden-Ca praeop.	26
7	Hay	8	m	Neurino-Sarkom am n. opticus 14 Tage postop.	26
8	Hae	68	m	Zungengrund-Ca mit Lymphknotenmetastasen praeop.	24
9	Ett	83	m	Larynx-Ca praeop.	24
10	Mau	70	m	Prostata-Neoplasma praeop.	22
11	Hes	77	m	Prostata-Neoplasma 4 Tage postop.	21
12	Bec	12	w	Fibrosarcom 2 Monate postop.	20
13	Jun	43	m	malignes Melanom vor Behandlung	20
14	Scu	63	m	Magen-Ca 3 Jahre postop. Rezidiv	20
15	Dav	65	m	Rectum-Neoplasma praeop.	20
16	Heu	64	m	Magen-Ca praeop.	20
17	Hal	69	m	Rectum-Neoplasma 14 Tage postop.	19
18	Wei	61	m	Prostata-Neoplasma 3 Tage postop.	18
19	Oss	69	m	Rectum-Neoplasma praeop.	18
20	Gfr	67	w	Blasen-Ca praeop.	17
21	Sau	80	m	Prostata-Neoplasma 14 Tage postop.	17

No.	Name	Alter	Geschl.	Diagnose	%-Hemmung
22	Leh	68	m	Schilddrüsen-Ca praeop.	17
23	Kle	69	m	Rectum-Neoplasma 3 Wochen postop.	17
24	Oes	66	m	Rectum-Neoplasma praeop.	17
25	Ran	60	m	Hypernephroides Ca praeop.	17
26	Zim	9	m	Astrocytom 6 Jahre postop.	16
27	Sum	43	w	Melanom vor der Behandlung	16
28	Spe	66	m	Hypernephroides Ca praeop.	16
29	Rot	65	w	Mamma-Ca 7 Tage postop.	15
30	Pas	53	m	Larynx-Ca praeop.	15
31	Hec	79	m	Hypernephroides Ca praeop.	13
32	Mes	62	m	Blasen-Papillom (malig.) 7 Tage postop.	13
33	Kuc	9	w	Astrocytom postop. 8Mon.	13
34	Web	66	m	Prostata-Neoplasma praeop.	12
35	Hor	22	w	Melanom 5 Tage postop.	12
36	Ker	85	m	Spinaliom (retroauri-kulär) 7 Tage postop.	12
37	Scn	48	m	Melanom 2 Tage postop.	11
38	And	12	m	Lymphosarkom postop. 6 Wochen	11
39	Dre	73	m	Blasen-Ca 7 Tage postop. und bestrahlt	11
40	Koc	68	w	Hypernephroides Ca praeop.	10
41	Bau	7	m	Rhabdomyosarkom 3 Jahre postop.	4
42	Mai	2	m	Neuroblastom praeop.	1

Tab.3 Die Migrationshemmungen bei 42 Tumorpatienten.

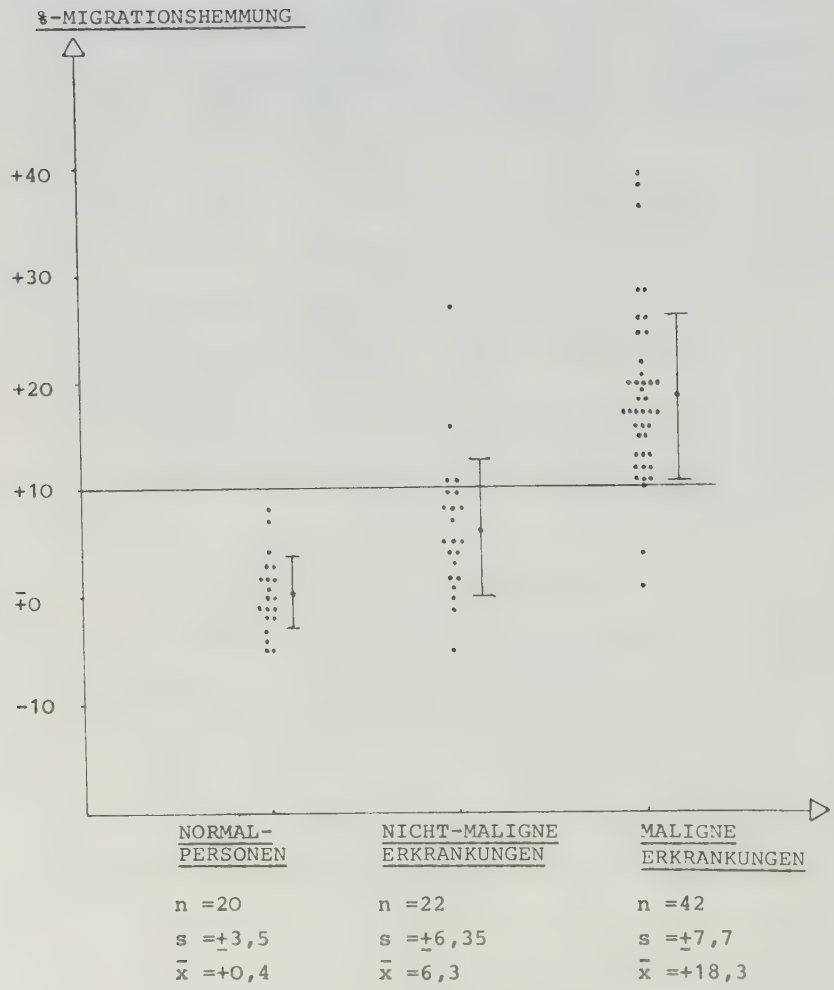


Abb.1 Vergleich der %-Migrationshemmung bei 20 Normalpersonen, 22 nicht-malignen Erkrankungen und bei 42 malignen Erkrankungen.

ÜBERSICHT ÜBER DIE MALIGNEN ERKRANKUNGEN,
EINGETEILT NACH ORGANLOKALISATION

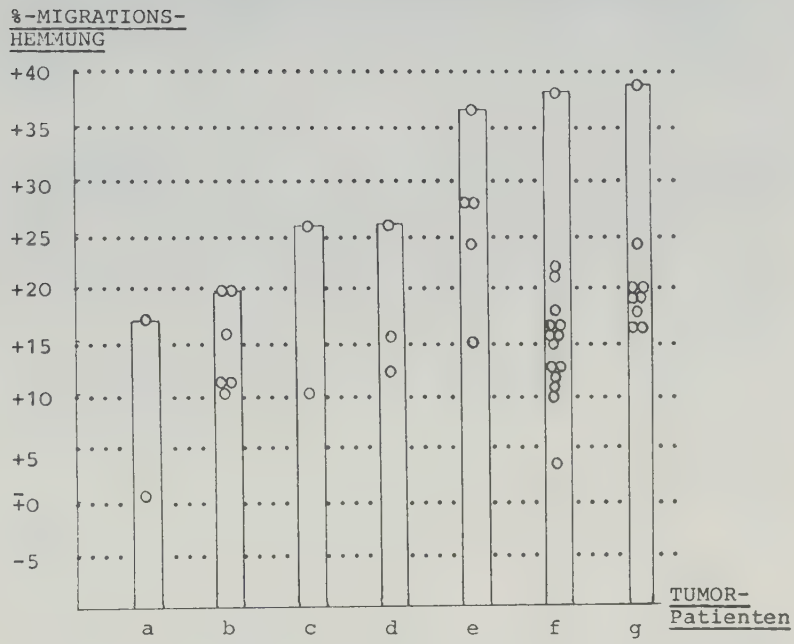


Abb.2 Einteilung der 42 malignen Erkrankungen nach Organlokalisation.

a = endocrine Drüsen (n = 2 / $\bar{x}$ = +9± 11).
b = Knochen / Haut (n = 6 / $\bar{x}$ = +15,1± 4,1).
c = Lymphat. Gewebe (n = 2 / $\bar{x}$ = +18,5± 10).
d = Zentralnervensystem (n = 3 / $\bar{x}$ = +18,3± 6,7).
e = Atmungsorgane (n = 5 / $\bar{x}$ = +26,2± 7,6).
f = Uro-genitale /
Gynäkologische Organe (n = 15 / $\bar{x}$ = +16,2± 7,5).
g = Verdauungsorgane (n = 9 / $\bar{x}$ = +21,5± 6,8).

VON DER ERST-DIAGNOSE ABWEICHENDES EMT-ERGEBNIS

Verdachtsdiagnose	EMT-Ergebnis	endgültige Diagnose
Ovarial-Ca	±0 %	Postmenopausenblutung
Knochen-Ca	+1 %	Osteomyelitis
Larynx-Ca	+2 %	Kehlkopf-Perichondritis
Blasen-Papillom	+13 %	malignes Papillom
Nierencyste	+13 %	hypernephroides-Ca
Nierencyste	+16 %	hypernephroides-Ca

Tab.4 Die Verdachtsdiagnose und die endgültige Diagnose bei 3 nicht-malignen und 3 malignen Erkrankungen, und das mit der endgültigen Diagnose übereinstimmende EMT-Ergebnis.

2.3. Antigen.[1]

Als Antigen wurde homologes basisches Myelinprotein verwendet. Es wurde gemäss Caspary und Field (7) gewonnen. Für unsere Messung ist eine Lösung von 0,3 mg EF/ml NaCl angesetzt worden.

2.4. Indikatorpartikel.[1]

Als Indikatorzellen wurden tannierte und sulfosalicylsäurestabilisierte (ETS)-Hammelerythrocyten verwendet (Porzsolt et al., 34). Durch die Tannierung können Proteine von der Erythrocytenmembran adsorbiert werden (Kwapinski, 23). Durch die Behandlung mit Sulfosalicylsäure wird Stabilität und Haltbarkeit der Erythrocyten erreicht (Becht, 1). Für die Messung wurden die Indikatorzellen auf $5x10^7$ ETS/ml HBSS eingestellt.

2.5. Testansatz.

1 ml Lymphocytensuspension ($5x10^6$/ml RPMI) wurde für 24 Stunden bei 37°C mit 3 ml EF-Lösung (0,3 mg EF/ml NaCl) inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Min. bei 250 g sind 3 ml des zellfreien Überstandes mit 1 ml Hammelerythrocyten für 90 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert worden. Sodann erfolgte die Messung der Migration im Cytopherometer.

2.6. O-Standard.

Als Bezugsgrösse für den Testansatz wurde ein sog. O-Standard nach Porzsolt et al., (34) hergestellt: 1ml RPMI, 2 ml HBSS und 1 ml ETS 90 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

2.7. Messung der elektrophoretischen Mobilität.

Die elektrophoretische Mobilität wird im Cytopherometer (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei einer Stromstärke von 6 mA

1 = hergestellt von Prof. Dr. W. Ax, Behring-Inst.Marburg

(130 V) bestimmt. Das Gerät besteht aus einem binokularen Mikroskop, das auf eine Messkammer gerichtet ist. Alle Messungen werden bei einer konstanten Temperatur von 23°C in der sog. vorderen stationären Ebene der Messkammer vorgenommen, einer Ebene mit der geringsten Flüssigkeitskonvektion (Abb.4).
Durch ein Netzmikrometer im Okular wird eine Strecke vorgegeben, die zu durchlaufen eine Zelle aufgrund ihres definierten Oberflächenpotentials eine bestimmte Zeit benötigt. Nach Umpolen der Stromrichtung wird die Zeit gemessen, die für die gleiche Zelle in umgekehrter Richtung erforderlich ist.
Durch Konvektionsströmungen und Mikrolecks (Preece et al., 35) sind die in beiden Richtungen gemessenen Zeiten nicht identisch, so dass man zur Berechnung das harmonische Mittel heranzieht (Porzsolt et al., 34):

$$t = \frac{2a\,(b-a)}{b}$$

a = Wanderungszeit in eine Richtung
b = Wanderungszeit für beide Richtungen zusammen
t = tatsächliche Wanderungsgeschwindigkeit

Es sollten nur solche Messungen berücksichtigt werden, deren Zeiten nicht um mehr als 10 % differieren (Pritchard et al., 36). Im günstigen Fall liegen die Differenzen unter 5 %.
Auf diese Weise werden 10 Einzelwerte bestimmt.
Das gleiche Vorgehen gilt ebenso für die Berechnung des O-Standards.
Über folgende Formel wird die prozentuale Abweichung der Testlösung vom Nullstandard bestimmt:

$$\%\text{-Hemmung} = \frac{t_t - t_o}{t_o} \times 100$$

t_o = arithmetisches Mittel der ETS-Zellen im O-Standard
t_t = arithmetisches Mittel in der Testprobe.
Werte von $>$ 10% Migrationshemmung wurden als positives, Werte von $<$ 10% als negatives Testergebnis definiert.

2.8. Ergebnisse.

Bei den 20 Normalpersonen (Tab.1) ergab sich im Mittel ein Wert von +0,4% bei einer Standardabweichung (=s) von $\pm$3,5. Es sind, wenn man einen Wert von +10% als Grenzwert ansetzt, keine "falsch positiven" Resultate zu verzeichnen (Abb.1).
Bei den 22 nicht-malignen Erkrankungen lag die Migrationshemmung im Mittel bei +6,3%. Die Standardabweichung betrug $\pm$ 6,35 (Abb.1). Patient Nr. 11 (Tab.2) hatte 1 Woche vor dieser Messung ein positives Testergebnis ($>$ +10%), wobei serologisch ein erhöhter Virustiter (Enterovirus) nachgewiesen werden konnte. Zum Zeitpunkt dieser Messung war der Titer bereits abgesunken, die Migration war nicht mehr gehemmt. Bei der Gruppe nicht-maligner Erkrankungen wurden 4 Patienten mit "falsch positiven" Ergebnissen registriert.
Die Migrationshemmung betrug bei den 42 malignen Erkrankungen (Tab.3) im Mittel +18,3%, die Standardabweichung $\pm$7,7. In dieser Untersuchungsgruppe sind 3 "falsch negative" Testergebnisse enthalten. (Abb.1), die Treffsicherheit liegt damit bei 92%. Patient Nr. 40 liegt mit +10% Hemmung gerade im Grenzbereich, die Patienten Nr. 41 und 42 sind eindeutig "falsch negativ" (siehe Diskussion).
Patient Nr. 25 konnte "1 Tag präoperativ" (+17% Hemmung), "3 Tage postoperativ" (+19%) und "8 Tage postoperativ" (+15%) gemessen werden. Es traten keine nennenswerten Unterschiede ($\bar{x}$ =+17$\pm$2%) der Werte bei den Wiederholungsmessungen auf.

In Abb. 2 sind die Malignome nach der Organlokalisation eingeteilt.
Tab. 4 zeigt in 6 Beispielen ein von der Erst-Diagnose abweichendes EMT-Ergebnis, welches dann durch die histologische Diagnose bestätigt wurde.

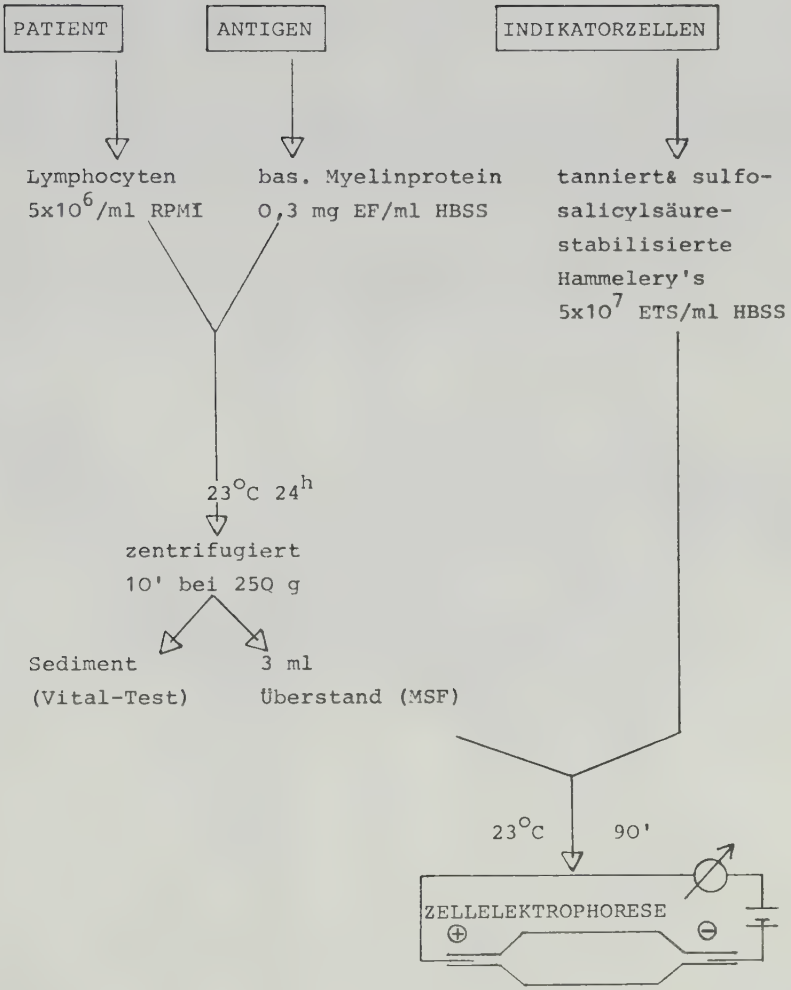
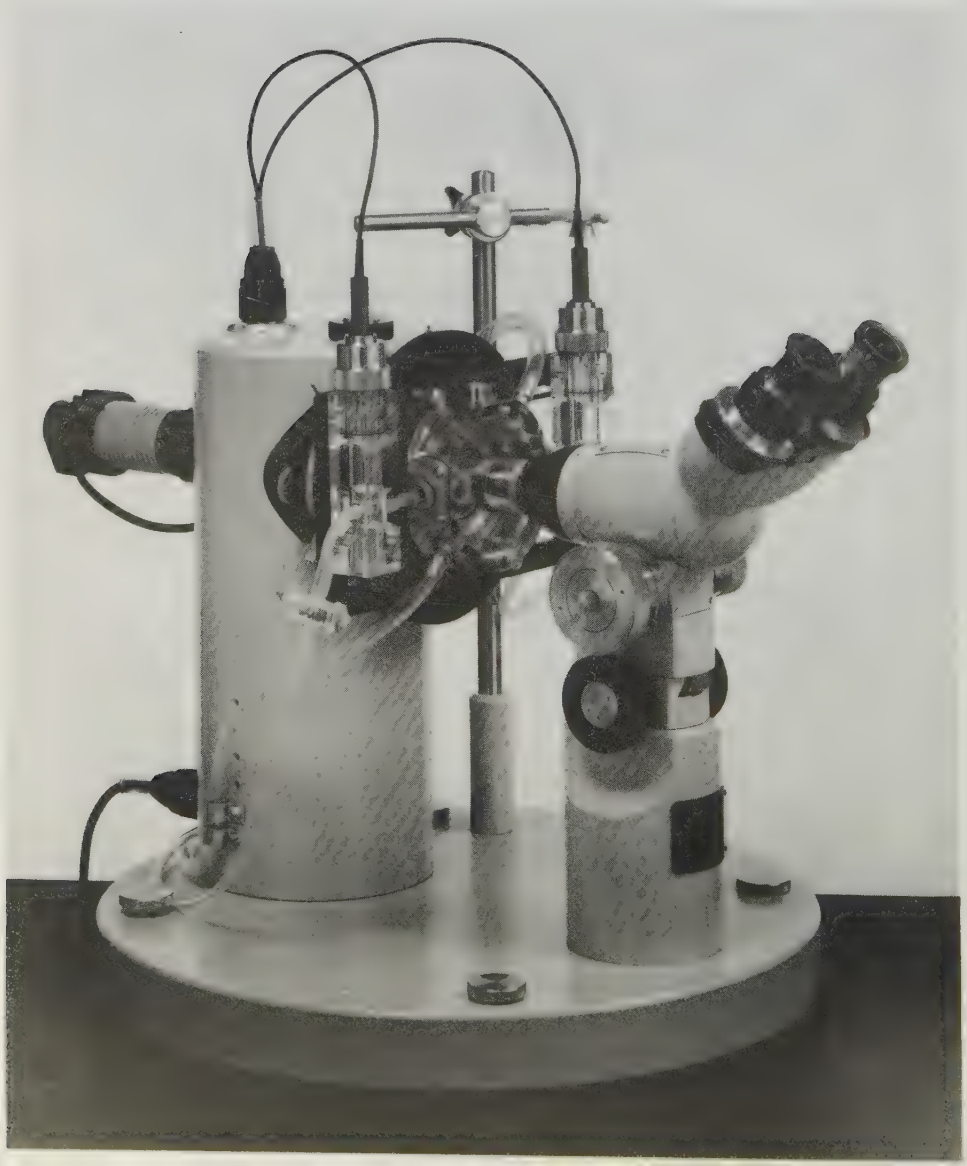


Abb.3 Schematische Übersicht über den Elektrophorese-Mobilitätstest nach Field & Casparv (14) in der Modifikation von Porzsolt et. al. (34).

Abb.4 Zytopherometer
(Fa. Zeiss)



3. ERGEBNISSE.

3.1. Kinetik der Mediatorproduktion.

Von 4 Tumorpatienten sowie 4 gesunden Kontrollpersonen wurden Testansätze hergestellt und mit EF inkubiert, wobei die Inkubationsdauer der einzelnen Proben 30 Minuten, 1 Std., 2 Std., 4 Std., 8 Std., 12 Std. und 24 Std. betrug.
Die nach Beendigung der Inkubation erhaltenen Überstände wurden einzeln wie oben beschrieben im Zytopherometer gemessen.
Der 30'-Wert bei den Tumorpatienten zeigte bereits eine Migrationshemmung, die im Vergleich zu den Kontrollpersonen noch zunahm, um nach 2^h ein Maximum zu erreichen. Die Hemmung nahm dann leicht ab, hielt sich aber noch im Mittel in einem Bereich oberhalb 12%, um nach 24 Std. im Mittel 17% zu erreichen.
Die Kontrollpersonen ergaben im 30'-Wert ebenfalls eine Migrationshemmung ($\bar{x}$ = 14,7%), diese nahm bei längeren Inkubationszeiten kontinuierlich ab bis zu einer Hemmung von 5% nach 24 Std. (Abb. 5a-c).
Dass diese anfängliche Migrationshemmung (30') durch die Beladung der Indikatorzellen mit EF bewirkt wurde und nicht etwa ein "falsch" positives Ergebnis darstellte verdeutlicht folgender Versuch:
3 ml EF wurden mit 1 ml RPMI vermischt und daraus wiederum wurden 3ml mit 1 ml ETS 90' inkubiert.
Daraus resultierte eine Migrationshemmung von +16,5% $\bar{+}$4,0 (n = 4).

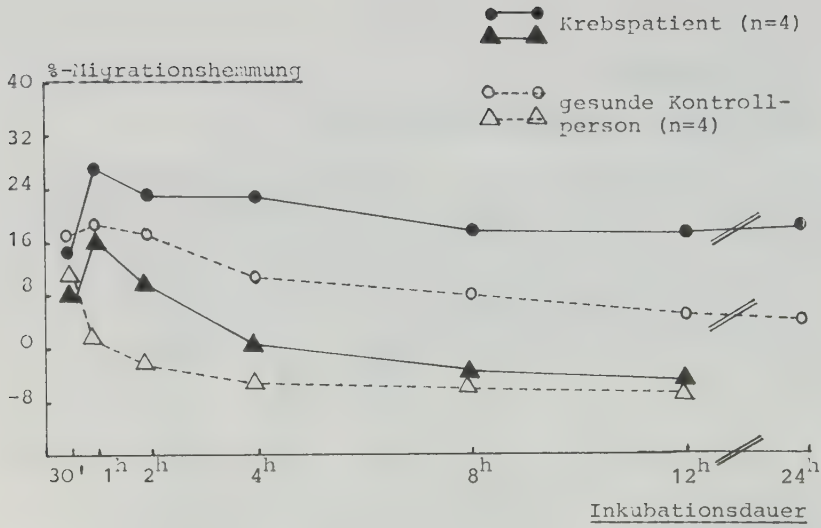


Abb.5a

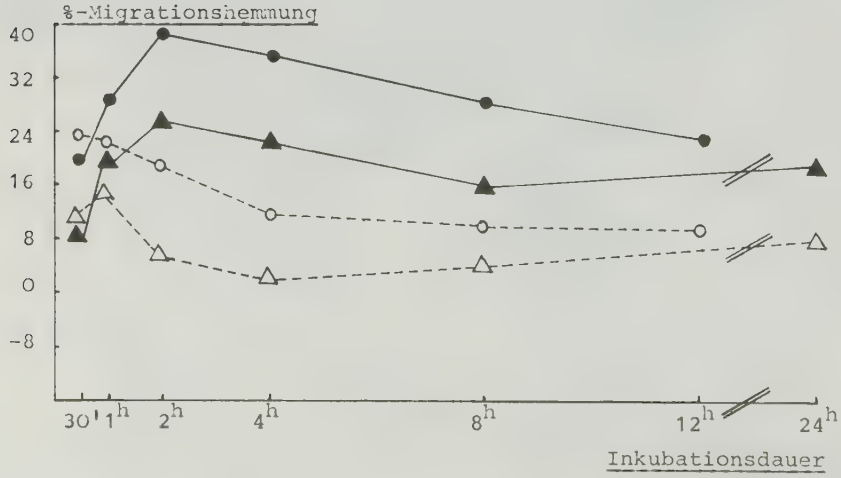


Abb.5b

Abb. 5a + 5b Einzelwerte der Migrationshemmung von 4 Krebspatienten und 4 gesunden Kontrollpersonen bei verschiedenen Inkubationszeiten.

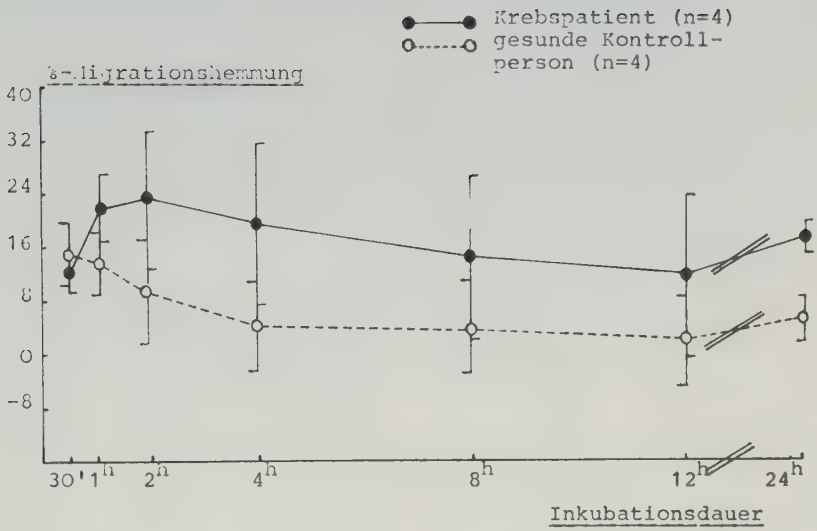


Abb.5c Mittelwert und Standardabweichung der Migrationshemmung von 4 Krebspatienten und 4 gesunden Kontrollpersonen bei verschiedenen Inkubationszeiten.

3.2 Testansätze mit verschiedenen Lymphocytenkonzentrationen.

Um zu untersuchen, inwieweit die Mediatorproduktion abhängig ist von der Zahl der stimulierten Lymphocyten, wurden bei einem Tumorpatienten 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 und 10^7 Lymphocyten/ml RPMI angesetzt, und nach der EF-Inkubation im Cytopherometer gemessen.

Lymphocytenkonz.	%-Migrationshemmung
10^3	-10%
10^4	+ 1%
10^5	+16%
10^6	+21%
10^7	+21%

Tab.5 Gegenüberstellung der Lymphocytenkonzentration und des entsprechenden Migrationswertes.

ERGEBNISSE: Wie aus Tab. 5 ersichtlich nimmt die Migrationshemmung mit steigender Lymphocytenzahl zu, um bei einer Konzentration zwischen $1 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ Ly/ml RPMI ein Plateau zu erreichen. Im Bereich von 10^5, 10^6 und 10^7 sind die Migrationsunterschiede wesentlich geringer als im Bereich von 10^3 und 10^4 (Abb.6).

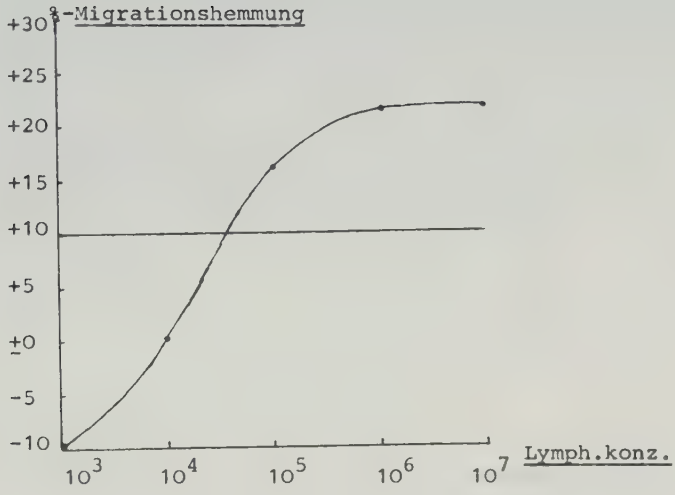


Abb.6 Abhängigkeit der Migrationshemmung von verschiedenen Lymphocytenkonzentrationen.

3.3. Verdünnungsversuche des mediatorhaltigen Überstandes.

In diesem Fall wurden vom selben Tumorpatienten (Leber-Ca) steigende Verdünnungen des mediatorhaltigen Überstandes angesetzt. Einmal wurden die üblichen 3 ml Überstand des Testansatzes gemessen, parallel dazu 2 ml mit Zusatz von 1 ml RPMI, 1,5 ml mit 1,5 ml RPMI und 1,0 ml mit 2 ml RPMI.

Konz. des mediatorhalt. Überstandes	%-Migrationshemmung
3 ml	+15%
2 ml	+13%
1,5 ml	+4%
1 ml	-2%

Tab.6 Die Konzentrationen des mediatorhaltigen Überstandes mit den entsprechenden Migrationen.

ERGEBNISSE: Entsprechend der zunehmenden Verdünnung nimmt die Migrationshemmung ab (Tab.6): bei Verwendung von 2 ml mediatorhaltigen Überstandes lässt sich noch keine nennenswerte Abweichung erkennen. Bei 1,5 ml ist jedoch keine spezifische Migrationshemmung mehr vorhanden, und bei 1,0 ml sind die ETS-Indikatorzellen sogar beschleunigt (Abb.7).

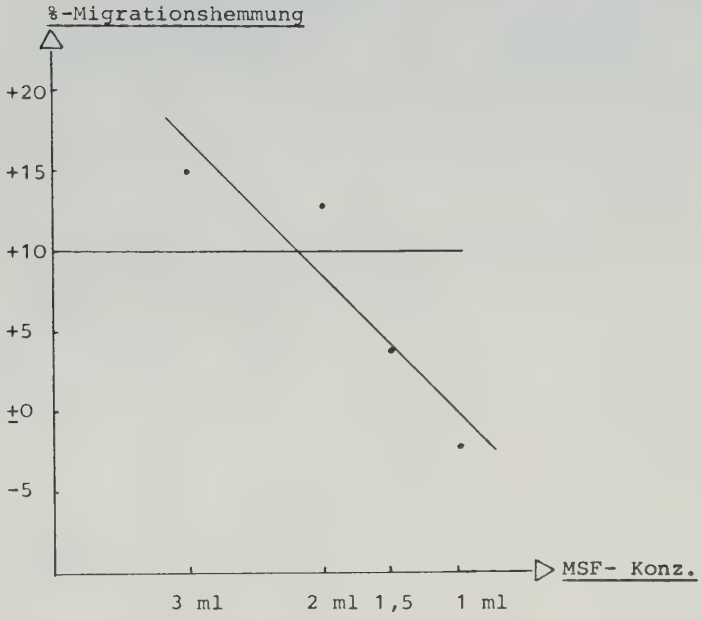


Abb.7 Abnehmende Migrationshemmung bei abnehmenden mediatorhaltigen Überstand (lineare Regression).

3.3.1. Erhitzen des mediatorhaltigen Überstandes.

Bei drei Tumorpatienten wurde der mediatorhaltige Überstand des Testansatzes sowie der O-Standard 30' bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung folgte die Inkubation mit den ETS-Indikatorzellen und die Messung im Cytopherometer.

Pat. Nr.	%-Migrationshemmung vor Erhitzen	nach 30' Erhitzen	Differenz
1. Leber-Ca	+15%	+5%	-10
2. Prostata-Neo	+13%	-2%	-15
3. Prostata Neo	+23%	+2%	-21
	$\bar{x}$=+17% s=±4,7	$\bar{x}$=+1,6% s=±2,4	

Tab.7 Die Migrationswerte vor Erhitzen der Probe und nach 30' Erhitzen.

ERGEBNISSE: In allen 3 Fällen ist die Hemmung durch das Erhitzen aufgehoben (Tab.7, Abb.8).
Da bei gleichartigem Erhitzen eines EF-haltigen Überstandes nachfolgend eine Beschleunigung der ETS beobachtet wird, erscheint die Schlussfolgerung, daß es sich bei dem MSF um eine hitzelabile Substanz handelt, noch verfrüht.

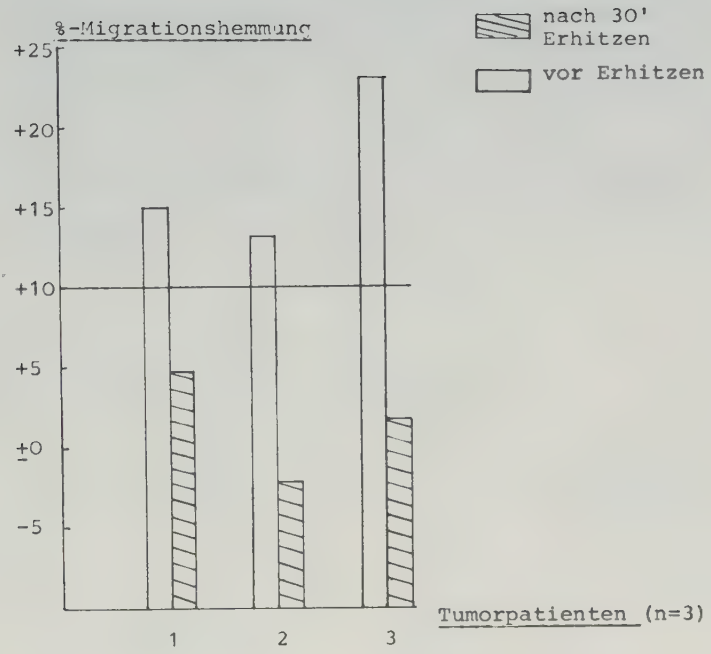


Abb.8 Übersicht über 3 Testansätze vor Erhitzen und nach 30' Erhitzen.

3.4. Versuche mit leukocytenreichem Überstand.

Bei 4 Tumorpatienten und 5 Kontrollpersonen wurde das heparinisierte Blut mit Dextran versehen und 60 Min. bei 37°C inkubiert. Der leukocytenreiche Überstand ("buffy-coat") wurde unter Umgehung der Ficolltrennung nach dreimaligem Waschen mit HBSS in RPMI resuspendiert und mit EF inkubiert. Die nach Beendigung der Inkubation erhaltenen Überstände wurden im Zytopherometer gemessen und mit entsprechenden Testansätzen gereinigter Lymphocyten verglichen. Es ist auch hier die für die Versuche gewählte Standardkonzentration von $5x10^6$ Lymphocyten/ml eingehalten worden.

NICHT MALIGNE ERKRANKUNGSGRUPPE

Pat.Nr.	%-Migrationshemmung Lymphocyten-Suspension	%-Migrationshemmung "buffy-coat" Suspension	Differenz
1. Normalperson	-1%	+10%	+11
2. Normalperson	+1%	+3%	+ 2
3. Normalperson	-5%	+3%	+ 8
4. Normalperson	-4%	+5%	+ 9
5. Bandscheiben-prolaps	+2%	+6%	+ 4
	$\bar{x}$=-1,4% $s=\pm 3,04$	$\bar{x}$=+5,4% $s=\pm 2,5$	

MALIGNE ERKRANKUNGSGRUPPE

Pat.Nr.	%-Migrationshemmung Lymphocyten-Suspension	%-Migrationshemmung "buffy-coat" Suspension	Differenz
6. Blasen-Ca	+11%	+14%	+ 3
7. Rektum-Neo	+18%	+26%	+ 8
8. Spinaliom	+12%	+16%	+ 4
9. Larynx-Ca	+36%	+35%	- 1
	$\bar{x}$=+19,2% $s=\pm 11,6$	$\bar{x}$=+22,7% $s=\pm 9,7$	

Tab.8 Gegenüberstellung der Migrationswerte bei Verwendung isolierter Lymphocyten und "buffy-coat" Zellen.

ERGEBNISSE: Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tab.8. Mit einer Ausnahme (Pat. Nr. 9) liegen die Migrationshemmungen bei Verwendung von "buffy-coat"-Zellen anstelle gereinigter Lymphocyten höher als die Ergebnisse nach Ficoll-Trennung, wobei die Differenz bei den Kontrollpersonen beträchtlich größer erscheint als bei den Krebspatienten (Abb.9a und 9b).

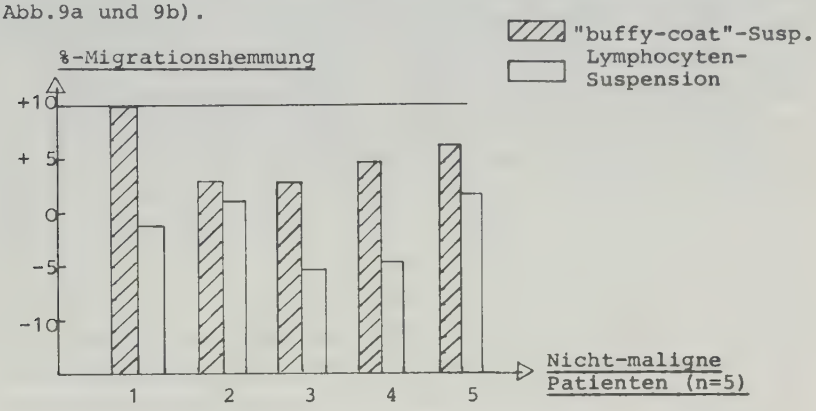


Abb. 9a

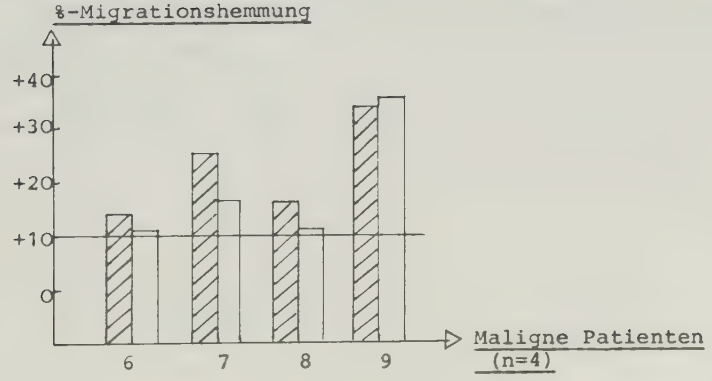


Abb.9b

Abb.9a und 9b Unterschiedliche Migrationen bei "buffy-coat" Zellen und Lymphocyten-Suspension.

3.5. B-Zell-Anreicherung.

Parallel zum üblichen Testansatz wurde eine B-Zell-Anreicherung vorgenommen: bei 7 Tumorpatienten sind die Lymphocyten nach der Gradienten-Zentrifugation und der dreimaligen HBSS-Waschung auf $5x10^6$/ml HBSS eingestellt worden. Durch die Inkubation mit Hammelerythrocyten in einer Konzentration von $8x10^7$/ml HBSS (pH 7,8 + 20% FKS) wurden die rosettenbildenden T-Zellen durch die Ficolltrennung sedimentiert ("pelleted E-RFC"), die aus der Interphase gewonnenen "unreinen B-Zellen" (<2% Rosetten) sind, nachdem sie mit HBSS gewaschen wurden, auf $5x10^6$/ml RPMI eingestellt und mit EF inkubiert worden. Die Überstände wurden im Zytopherometer gemessen, und den unfraktionierten Lymphocyten gegenübergestellt (Tab.9).
Die bei der Ficolltrennung abzentrifugierten Rosetten ("unreinen T-Zellen") wurden mit HBSS gewaschen und, nachdem sie auf $5x10^6$/ml RPMI eingestellt wurden, mit EF inkubiert. Der MSF-haltige Überstand wurde im Zytopherometer gemessen, und den unfraktionierten Lymphocyten und "B-Zellen" gegenübergestellt.
Eine mögliche Nachweismethode der T-Lymphocyten ist durch die Bindung an Hammelerythrocyten (=Rosettentest) gegeben (Seiler u. Mitarb., 41).Die "erythrocyte rosette-forming lymphocytes" (E-RFC) dienen der Klassifizierung beispielsweise von Granulomatosen und Neoplasien des weissen Blutbildes (Cohnen et al.,9).

Pat.Nr.	a	b	c	d
1. Rectum-Neo	+21%	+19%	+15%	36%
2. Zungengrund-Ca	+48%	+24%	+38%	50%
3. Larynx-Ca	+50%	+28%	+45%	60%
4. Prostata-Neo	+22%	+18%	+34%	45%
5. Prostata-Neo	+25%	+12%	+29%	55%
6. Melanom	+24%	+12%		60%
7. Schilddrüsen-Ca	+19%	+17%		60%
	$\bar{x}$=+29,8% s=±13,2	$\bar{x}$=+18,5% s=±6	$\bar{x}$=+32% s=±11	$\bar{x}$=52% s=±9,2

Tab.9 Die Migrationshemmungen von "B-Zellen", unfraktionierten Lymphocyten bei 7 Tumorpatienten und von "pelleted E-RFC" bei 5 Tumorpatienten.

a = Lymphocyten nach Entfernung von E-RFC
b = unfraktionierte Lymphocyten
c = "pelleted E-RFC"
} Migrationshemmung in %.
d = Anteil der E-RFC in %.

ERGEBNIS: Wie aus Tab.9 zu ersehen ist, führt die B-Zell-Anreicherung ausnahmslos zu Migrationshemmungen, die stärker ausgeprägt sind als bei den unfraktionierten Lymphocyten ($0,01<p<0,02$). Bei den "pelleted E-RFC" sind die Migrationshemmungen gegenüber den unfraktionierten Lymphocyten ebenfalls stärker, gegenüber den "B-Zellen" ist kein signifikanter Unterschied vorhanden (Abb.10).

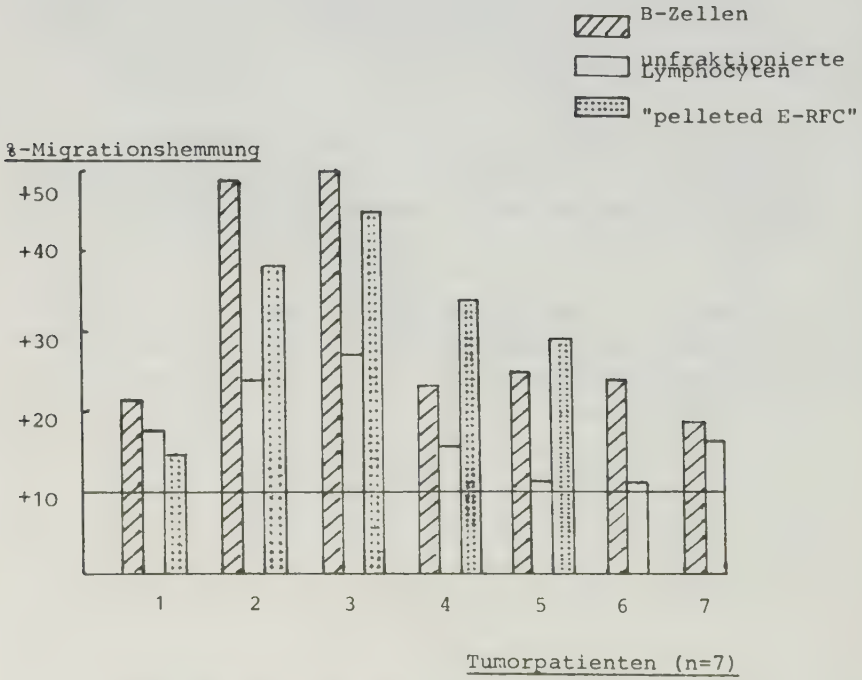


Abb.10 Gegenüberstellung der Migrationshemmung von B-Zellen, unfraktionierten Lymphocyten bei 7 Tumorpatienten und "pelleted E-RFC" bei 5 Tumorpatienten.

3.6. T-Zell-Anreicherung.

Parallel zum üblichen Testansatz wurden bei 9 Tumorpatienten "reine T-Zellen" angesetzt. Sie waren frei von adhärenten Zellen, von Fc-Receptor-tragenden Lymphocyten und von S-Ig-pos. Zellen, (s="surface"). Die Präparation erfolgte nach Golstein et al. (18), modifiziert nach Rieber et al. (38): an die Ficolltrennung schloss sich eine Plastik-Cytoadhärenz an. Nach der Filtration in der Nylon-Säule bestand die Lösung aus ca. 60% E-RFC ("rosette forming cells"), aus ca. 10-20% Fc.pos. Lymphocyten und aus ca. 10% S-Ig. pos. Lymphocyten. Es folgte eine Filtration über die IgG anti IgG-Säule, so dass man weitgehend reine T-Lymphocyten gewonnen hatte: $< 0{,}1\%$ Fc.pos., $< 0{,}1\%$ S-Ig-pos. und $> 95\%$ E-RFC. Nach der EF-Inkubation wurden die Überstände dieser T-Lymphocyten im Zytopherometer gemessen und mit den unfraktionierten Lymphocyten verglichen.
Bei drei Patienten (Nr.5, 6 und 7) wurden zu je 1 ml "reinen T-Zellen" noch die eliminierten Makrophagen hinzugefügt, bei vier Patienten (Nr. 6, 7, 8 und 9) kamen zu den T-Zell-Fraktionen zusätzlich $1x10^5$ Zellen der unfraktionierten Lymphocyten hinzu.
Um eine Schädigung der Lymphocyten während der verschiedenen Präparationsschritte der T-Zell-Isolierung auszuschliessen, wurden neben der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau bei drei Patienten (Nr.2, 4 und 5) Stimulationsversuche mit PHA durchgeführt (Abb.9): nach der Ficolltrennung und den HBSS-Waschungen wurden Lymphocyten auf $1x10^6$/ml RPMI eingestellt, und in einer Mikroplatte mit aufsteigenden Konzentrationen von Phythämagglutinin (PHA) 72^h bei 37^oC inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubation mit ^3H-Thymidin wurde im Packard-Liquid-Scintillation-Spectrometer die Aktivität gemessen.

ERGEBNISSE:

Pat.Nr.	a	b	c	d
1. Melanom	+11%	-7%	60%	97,7%
2. Larynx-Ca	+15%	+6%	60%	90%
3. Melanom	+12%	+3%	60%	97%
4. Schild-drüsen-Ca	+17%	+6%	60%	95%
5. Blasen-Ca	+23%	+7%	40%	97%
6. Sigma-Neo	+24%	+5%	55%	97%
7. Rectum-Neo	+17%	+13%	45%	97%
8. Prostata-Neo	+13%	+6%	40%	96%
9. Prostata-Neo	+23%	+15%	45%	98%
	$\bar{x}$=+17,2% s=±5	$\bar{x}$=+6% s=±6,2	$\bar{x}$=52% s=±9	$\bar{x}$=96% s=±2,4

Tab.10 EMT-Ergebnis und Rosettentest der Gesamt- und T-Zell-Fraktion bei 9 Tumorpatienten.

a = Lymphocyten-Gesamtfraktion
b = Lymphocyten-T-Zell-Fraktion } Migrat.hemm. in %.
c = Rosetten der Gesamtfrakt. in %
d = Rosetten der T-Zell-Fraktion in %.

Aus Tab. 10 ist ersichtlich, daß bei den T-Zell-Fraktionen die Migrationshemmungen gegenüber den Gesamtfraktionen durchweg geringer sind (Abb.11). Bei zwei Patienten (Nr. 7 und 9) sind die Migrationen noch im spezifischen Bereich (> +10%).Der Vergleich der Migrationshemmungen ergibt beim einzelnen Patienten zum Teil deutliche Unterschiede. Der Vergleich der beiden Gruppen untereinander ergibt einen p-Wert a:b =< 0,001, der Unterschied ist statistisch signifikant.

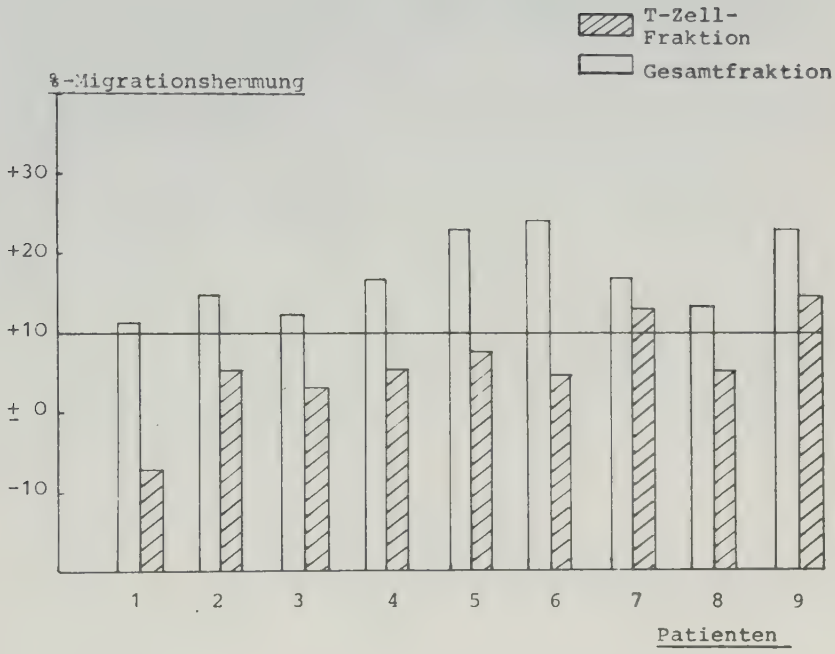


Abb.11 Übersicht der T-Zell-Fraktion und Gesamtfraktion bei 9 Tumorpatienten.

Die Hinzugabe von Makrophagen führt zu keiner Änderung des Befundes. Durch Hinzugabe von $1x10^5$ unfraktionierten Lymphocyten wird bei den Patienten Nr. 7, 8 und 9 eine spezifische Migrationshemmung erreicht. Die T-Lymphocyten ergeben im Trypanblau-Test > 95% vitale Zellen, und sie lassen sich mit PHA stimulieren (Abb. 12).

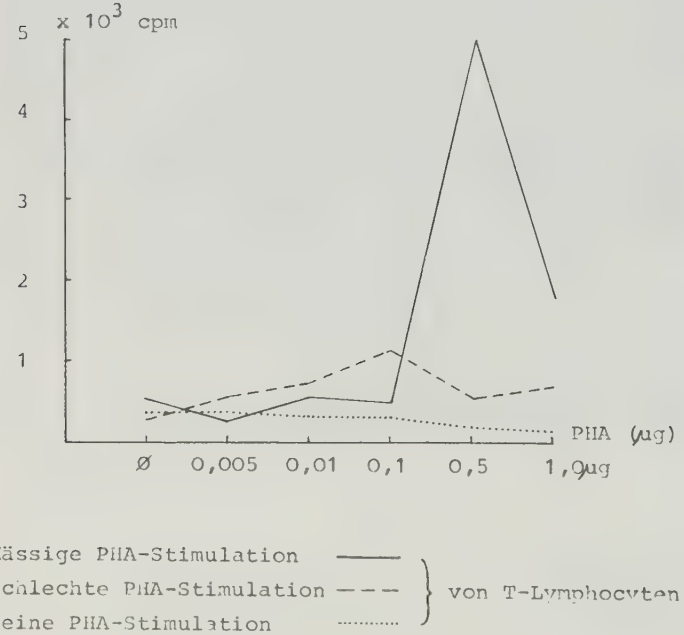


Abb.12 Die PHA-Stimulationen von drei Tumorpatienten (Nr.2, 4 und 5) bei verschiedenen Konzentrationen.

3.7. Makrophagen-Elimination.

Nach vorheriger Makrophagenelimination wurden bei 5 Tumorpatienten neben dem üblichen Testansatz Lymphocyten auf ihre Fähigkeit Mediatoren zu produzieren untersucht. Nach der Ficolltrennung und den HBSS-Waschungen wurden die Lymphozyten in RPMI ohne Serumzusatz aufgenommen und für 90' bei 37° (Brutschrank und CO_2) im Falcon-Plastikschälchen inkubiert. Nachdem die Lymphocyten vorsichtig mit RPMI abgewaschen wurden, blieben die Makrophagen am Grund haften. Das Pappenheim-Präparat dieser Zellen ergibt nach dem Abwaschen durchschnittlich ca. 45% Lymphocyten, 20% Granulocyten und bis zu 35% Monocyten. Der Trypanblau-Test ergab zwischen 90% und 95% vitale Zellen.
Die so gewonnenen Lymphocyten wurden in HBSS gewaschen und in RPMI neu resuspendiert. Es folgte die Inkubation mit EF, und nach 24h die Messung im Cytopherometer. Die Ergebnisse wurden den Lymphocyten mit Makrophagen gegenübergestellt (Tab.11).

Pat.Nr.	Migrat.hemmung in % Lymphocyten mit Makrophagen	ohne Makrophagen	Differenz
1. hypernephr. Ca	+15%	+18,5%	+3,5
2. hypernephr.Ca	+13%	+16,5%	+3,5
3. Larynx-Ca	+28%	+33%	+5
4. Blasen-Ca	+13%	+19%	+6
5. Prostata-Neo	+17%	+35%	+18
	$\bar{x}$=+17,2% s=±6,4	$\bar{x}$=+24,4% s=±8,8	

Tab.11 Vergleich der Migrationshemmungen (bei 5 Tumorpatienten) von Lymphocyten mit Makrophagen und von Lymphocyten ohne Makrophagen.

ERGEBNISSE: Der Test ergibt in allen 5 Fällen nach Makrophagen-Eliminationen stärkere Migrationshemmungen als beim üblichen Testansatz (Abb.13).

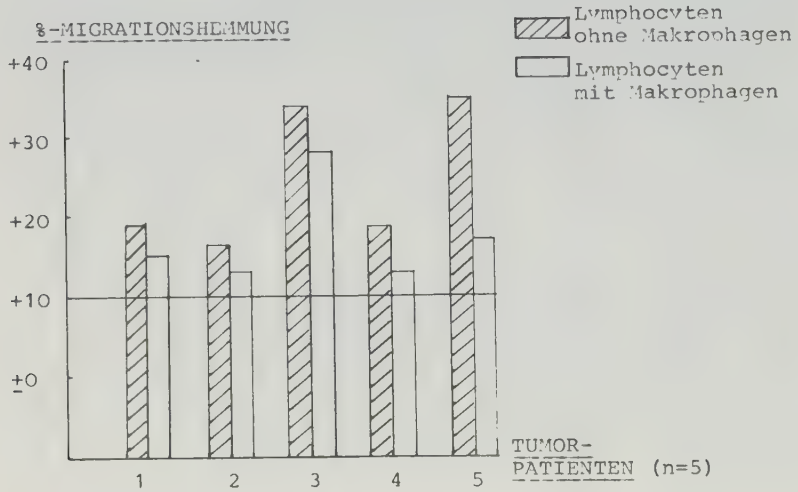


Abb.13 Die unterschiedliche Migrationshemmung beim üblichen Testansatz und nach Makrophagen-Elimination.

3.8. Waschen der ETS-Indikatorzellen mit HBSS.

Bei 3 Tumorpatienten mit nachgewiesener Migrationshemmung (> +10%) wurden die ETS-Indikatorzellen nach der Messung im Cytopherometer noch dreimal mit HBSS gewaschen, um zu untersuchen, ob der "slowing factor" erhalten bleibt oder nicht. Die abzentrifugierten ETS-Zellen wurden anschliessend einmal im ursprünglichen, d.h. mediatorhaltigen Medium und einmal im frischen Medium resuspendiert. Dasselbe wurde mit dem O-Standard durchgeführt.

	Migrat. hemmung in %			
	Pat.1	Pat. 2	Pat. 3	
Üblicher Testansatz	+24%	+24%	+23%	$\bar{x}$=+23,6±0,6%
nach ETS-Waschung Resusp. in Med. Testansatz	+12%	+4%	+12%	$\bar{x}$=+9,3±4,6%
nach ETS-Waschung Resusp. frisches Med.	-2%	-9%	-10%	$\bar{x}$=-7±4,4%

Tab.12 Gegenüberstellung von üblichem Testansatz und den Messungen nach dreimaligen HBSS-Waschungen der ETS-Indikatorzellen.

ERGEBNISSE: Eine vorhandene Migrationshemmung lässt sich durch dreimalige HBSS-Waschungen der ETS-Indikatorzellen vermindern (Tab.12); bei Resuspendierung im ursprünglichen

Medium in geringerem Ausmasse (hier liegen immerhin noch 2 Messungen über der +10%-Grenze), bei Resuspendierung in frischem RPMI-Medium allerdings in starkem Ausmasse (Abb.14).

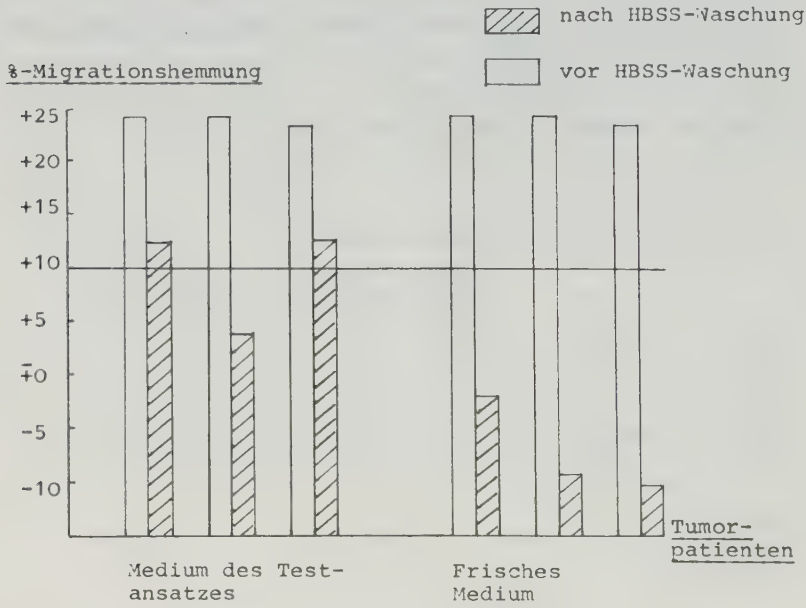


Abb.14 Die Unterschiede bei 3 Tumorpatienten zwischen üblichem Testverfahren und den Messergebnissen nach dreimaligen HBSS-Waschungen der ETS-Indikatorzellen: einmal bei Verwendung von Medium des Testansatzes und einmal bei Resuspendierung in frischem Medium.

3.9. 10 x Waschen der Lymphocyten.

Um Serumfaktoren ausschliessen zu können, wurden bei 5 Tumorpatienten parallel zum üblichen Test die Lymphocyten nicht dreimal, sondern zehnmal in HBSS gewaschen. Nach der Einstellung auf 5x 10^6/ml RPMI und der EF-Inkubation folgte die Messung im Cytopherometer.

Pat.Nr.	Migrat. hemmung in % Lymphocyten 3x waschen	10x waschen	Differenz
1. Larynx-Ca	+28%	+23%	-5
2. Blasen-Ca	+13%	+ 5%	-8
3. Nieren-Ca	+15%	+12%	-3
4. Sigma-Neo	+24%	+20%	-4
5. Nieren-Ca	+23%	+18%	-5
	$\bar{x}$=+20,6% s=±6,3	$\bar{x}$=+15,6% s=±7	

Tab.13 Gegenüberstellung der Migrationswerte nach zehnmaligem Waschen der Lymphocyten und bei dreimaligem Waschen.

ERGEBNISSE: In allen 5 Fällen lassen sich die Hemmungen nach den zehn HBSS-Waschungen gegenüber dem üblichen Testansatz verringern (Tab.13), jedoch liegen die Differenzen im Bereich der Schwankungsbreite der Messmethode. Mit einer Ausnahme (Pat.Nr.2) liegen die Migrationswerte noch im spezifischen Bereich (Abb.15).
Bei Pat.Nr.2 fiel der Trypanblau-Test nach den zehn HBSS-Waschungen mit 15% letalen Lymphocyten recht hoch aus. Darin dürfte die Erklärung für das "falsch-negative" Ergebnis liegen. Bei den übrigen Patienten betrug die Vitalität $>$95%.

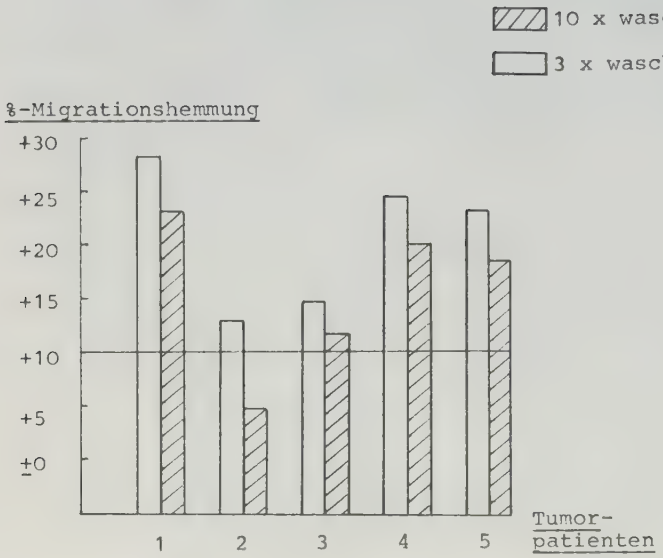


Abb.15 Die unterschiedliche Migrationshemmung bei 5 Tumorpatienten nach zehnmaligem Waschen der Lymphocyten und bei dreimaligem Waschen.

4. DISKUSSION

Field und Caspary (14) entwickelten den Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test für die immunologische Karzinomdiagnose. Die Methode wurde durch zahlreiche Arbeitsgruppen bestätigt (Goldstone et al. (17), Meyer-Rienecker et al. (26), Pritchard et al., (36)). Trotz der hohen Trefferquote von >99% (Field et al., 16) konnte der Test sich nicht durchsetzen, er blieb auch nicht unwidersprochen (Lewkonia et al., 24). Eine Schwierigkeit ist der technische und apparative Aufwand; über Grösse der Geschwulst und dem Grad der Metastasierung kann keine Aussage gemacht werden (Meyer-Rienecker u. Mitarb., 25). Eine Spezifizierung des Testes erscheint durch Anwendung tumorspezifischer Antigene möglich geworden (Müller u. Mitarb., 28).
Was gegen die Einführung des EM-Testes als allgemeiner "Krebs-Vorsorge-Test" (Screening) spricht, sind nicht die relativ wenigen "falsch negativen" Ergebnisse auf dem Boden einer Tumorkachexie mit Versagen der immunologischen Reaktionsfähigkeit (Nind et al., 29), sondern die "falsch positiven" Resultate bei neurologischen Erkrankungen mit Sensibilisierung gegen Myelinprotein (Caspary et al. (8), Meyer-Rienecker u. Mitarb. (26)), sowie jene nach viralen Infekten, florider Tuberkulose, Sarkoidose, Rheumatoidarthritis, M. Krohn sowie Kollagenosen und anderen selteneren Autoimmunerkrankungen (Field et al., 16, Schneider, 39). Diese Tatsache spricht nicht gegen die Methode an sich, denn Jülich et al. (22) stellten eine Korrelation zwischen Rhodanidspiegel und positivem MEM-Ergebnis fest, sowohl bei Patienten mit malignen Erkrankungen, als auch bei Autoaggressionskrankheiten und nach Transplantationen. Die cytostatische Wirkung des Rhodanids (≙ Thiocyanat) ist bekannt (Beickert u. Mitarb.,2).

Die Modifikation nach Porzsolt et al. (34) erbrachte eine methodische Vereinfachung und die Möglichkeit einer weitgehenden Standardisierung, bei einer Trefferquote von > 87%. Jenssen et al. (21) bestätigten die Vorteile der ETS-Indikatorzellen gegenüber den Meerschweinchenmakrophagen.
Für weitere Verbesserungen der Methode ist eine genaue Kenntnis des Wirkungsmechanismus Voraussetzung. Ziel der Arbeit war es daher, Versuche zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus durchzuführen und damit möglicherweise Ansatzpunkte für eine Optimierung des Testablaufes zu finden.
Bisher sind nur vereinzelte Publikationen zu diesem Thema erschienen. So beschrieben Carnegie et al. (3) Versuche mit verschiedenen Lymphocyten- und MSF-Konzentrationen. Entsprechend der Konzentrationsabnahme registrierten sie eine Abnahme der Migrationshemmung.
Caspary (6) behandelte Lymphocyten und Makrophagen jeweils mit Proteinsyntheseinhibitoren, vor, während und nach der Inkubation mit Antigen. Bei Gabe von Proteinsyntheseinhibitoren vor und während der Inkubation von Lymphocyten mit Antigen, war keine Migrationshemmung vorhanden, bei Gabe des Inhibitors 30 Minuten nach Antigengabe, blieb die Migrationshemmung erhalten. Caspary zog den Schluss, dass der "slowing effect" keine passive Bindung des Antigens mit der Zelloberfläche darstellen kann, sondern vielmehr einen vitalen Prozess, der einer Proteinsynthese (David et al., 10) gleichkommen muß. Daß die entscheidende Rolle dabei den Lymphocyten zufällt, bewies er dadurch, daß durch Zugabe von 1% Makrophagen + 1% peritonealen Lymphocyten sich keine Migrationshemmung ergab, dass aber bei einer Konzentration von 2% peritonealen oder peripheren Lymphocyten eine spezifische Migrationshemmung nachweisbar wurde. Um die Rolle der Makrophagen zu erforschen, behandelte

Caspary auch sie 30 Minuten vor und 30 Minuten nach Antigengabe ("mixed lymphocyte supernate") mit einem Proteinsyntheseinhibitor. Bei Gabe des Inhibitors vor der Antigen-Inkubation war auch hier keine Migrationshemmung mehr vorhanden; die Gabe nach Antigen-Inkubation hatte aber keinen Effekt. Es zeigte sich hier, dass aktive Syntheseprozesse der Makrophagen für den "slowing effect" mitverantwortlich sein müssen (Pritchard et al., 37).
Porzsolt et al. (34) testeten verschiedene EF-Konzentrationen in ihrem Einfluss auf die Indikatorzellen (ETS) und fanden, dass EF bei einer Konzentration von 0,3 mg/ml eine Neutralisierung der negativen Überschußladung und damit einen Stillstand im elektrischen Feld bewirkte. Um schliesslich festzustellen, ob die Hemmung durch den EF oder durch den Mediator bedingt ist, untersuchten sie mit Puromycin behandelte und unbehandelte Lymphocyten nach verschiedenen Inkubationszeiten mit EF. Bei Tumorpatienten registrierten Porzsolt et al. eine maximale Hemmung der ETS-Partikel bereits nach 60 Minuten Inkubation, welche mit Dauer der Inkubation abnahm, wobei aber die Migrationshemmung nach 24 Stunden noch deutlich über 10% lag. Die puromycinbehandelten Lymphocyten der Tumorpatienten verhielten sich wie die von Normalpatienten, d.h. es war keine Hemmung nachweisbar. Porzsolt et al. zogen nun den Schluss, dass während der ersten 60 Minuten eine Proteinsynthese der Lymphocyten von Tumorpatienten, die mit einer Migrationshemmung der ETS-Zellen nachweisbar war, durch das Puromycin gehemmt werden kann.
Die Annahme, dass es sich bei diesem Testverfahren um den Nachweis einer zellvermittelten, d.h. durch T-Zellen bedingten Immunreaktion handelt, muss durch die hier vorgelegte Arbeit in Frage gestellt werden. Bei Verwendung der

"reinen T-Zell-Fraktion" von Tumorpatienten (Kapitel 3.6.) war in 7 von 9 Fällen eine Migrationshemmung nicht mehr vorhanden. In 2 Fällen lag die Hemmung noch über 10%, aber eindeutig niedriger als bei Verwendung nicht-fraktionierter Lymphocyten. Auch die Hinzugabe von Makrophagen führte zu keiner Änderung der Ergebnisse. Erst durch die Hinzugabe von $1x10^5$ unfraktionierten Lymphocyten zum Testansatz wurde wieder eine Migrationshemmung von >10% beobachtet. Die gereinigte T-Zellfraktion allein erscheint demnach nicht für die Migrationshemmung verantwortlich zu sein. Zur PHA-Stimulation der "T-Zellen" (Abb.12) muss angefügt werden, dass selbst bei gesunden Personen die T-Lymphocyten ohne Makrophagen sich nur mässig stimulieren lassen (Oppenheim et al. (30), Seeger et al. (40)).
Dass die rosettenbildenden Zellen ("pelleted E-RFC", Kap. 3.5.) sich gegenüber den "B-Zellen" nicht unterscheiden, also weit im positiven Bereich liegen, steht nicht im Widerspruch zum vorher gesagten, da es sich hierbei nur um angereicherte T-Zellen handelt, bedingt durch die unterschiedliche Art der Gewinnung.
Diese doch relativ unspezifischen Trennverfahren liefern statistisch signifikante Ergebnisse der jeweiligen Zellfraktionen untereinander (Kap. 3.5. + 3.6.).
Die durch Rosettenelimination gewonnenen "B-Zellen" (Kap. 3.5.) führten ausnahmslos bei den untersuchten 7 Fällen zu stärkeren Migrationshemmungen als bei den unfraktionierten Lymphocyten.
Die Elimination von Makrophagen (Kap.3.7.) ergab in allen Versuchen eine stärkere Migrationshemmung als bei Ansätzen von Lymphocyten mit Makrophagen. Diese Befunde könnten für eine entscheidende Beteiligung der nicht ro-

settenbildenden Zellen (B-Zellen ?) am Zustandekommen der Migrationshemmung sprechen.
Eine Isolierung des "slowing factors" wäre für die weitere Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieses Faktors wünschenswert. So meinten Pick et al. (32) es würde sich beim MSF um einen Phosphodiesterase-Inhibitor handeln, der einen Anstieg des intracellulären cAMP-Gehaltes bewirke. Aus Kap. 3.8. ist zu ersehen, dass der "slowing factor" durch dreimalige HBSS-Waschungen der ETS-Indikatorzellen zu eliminieren ist und bei Resuspendierung der gewaschenen ETS im ursprünglichen, konditionierten Medium, wenn auch in geringerem Maße, noch nachweisbar ist. Werden im Gegensatz dazu die gewaschenen ETS in frischem RPMI-Medium resuspendiert, so ist keine Hemmung mehr vorhanden. Im ursprünglichen Medium scheint daher noch genügend "Hemmfaktor" vorhanden zu sein, um in 2 von 3 Fällen eine Migrationshemmung von über 10% zu bewirken. Ob es sich beim "slowing factor" um ein hitzelabiles Protein handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden (Kap.3.3.1.), da EF ohne Hinzugabe von Lymphocyten nach dem Erhitzen ebenfalls eine Beschleunigung der Indikatorzellen verursachte.
Eine Verdünnung des "slowing factors" (Kap.3.3.) führt zu einer proportionalen Abnahme der Migrationshemmung. Eine Dosisabhängigkeit der Migrationshemmung besteht ebenfalls zur Lymphocytenkonzentration (Kap.3.2.). Diese Beobachtung stimmt mit den Versuchen von Carnegie et al.,3, überein. Im Vergleich zu Lymphocyten, die durch Ficoll-Gradienten-Zentrifugation angereichert wurden, konnte mit leukocytenreichem Überstand (="buffy coat",Kap.3.4.) eine deutlich stärkere Migrationshemmung erzielt werden. Bei Leukocytenpräparationen von Normalpersonen zeigte sich eine Migrationshemmung bis knapp unter den"falsch positiven" Bereich.

Granulocyten und die bei Zerfall aus ihnen freigesetzten Proteinasen sowie Serumbestandteile sind dabei nicht zu unterschätzende Störfaktoren. Um Serumfaktoren völlig ausschliessen zu können, wurden in 5 Fällen die Lymphocyten nicht nur dreimal, sondern zehnmal in HBSS gewaschen (Kap. 3.9.).In allen 5 Fällen waren die Hemmungen geringer als beim üblichen Testansatz, aber in 4 Fällen noch im Bereich über 10%. Aus diesem Ergebnis kann vermutet werden, dass bei diesem Elektrophorese-Mobilitäts-Test Serumbestandteile wahrscheinlich keine Rolle spielen.

Die Untersuchungen über die Kinetik der Mediatorproduktion (Kap.3.1.) deckten sich weitgehend mit den Ergebnissen von Porzsolt et al. (34). Das Maximum der Migrationshemmung bei Tumorpatienten lag bei diesen Versuchen um den 2-Stunden-Wert. Es erscheint daher möglich, schon nach 2-bis 4-stündiger Inkubation die Migrationshemmung im Cytopherometer zu bestimmen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit eines "falsch positiven" Resultates größer, da besonders bei Normalpersonen in der frühen Inkubationsphase eine deutliche Migrationshemmung zu messen ist, die erst nach längerer Inkubation abfällt.

Aus den Untersuchungen von 20 Normalpersonen ist ersichtlich, daß keine "falsch positiven" Resultate zu beobachten sind (Kap.2.8.), wenn man als Grenzwert + 10% Hemmung ansetzt. Bei gesunden Personen, die im Labor mit EF-Präparationen umgehen, sind von Caspary et al., (8) positive Messergebnisse mitgeteilt worden. Bei den 22 nicht-malignen Erkrankungen fanden sich bei 4 Patienten "falsch positive" Ergebnisse. Bei den Patienten Nr. 1 und 2 handelt es sich um neurologische Erkrankungen, wobei am ehesten eine Sensibilisierung mit EF vorliegen könnte, wie sie

auch von Caspary et al. (8) beschrieben wurde. Bei Patient 3 und 4 (Appendicitis und akute Glomerulo-Nephritis) ließ sich keine eindeutige Erklärung für das "falsch positive" Testergebnis finden.
Bei den 42 malignen Erkrankungen sind 3 "falsch negative" Ergebnisse zu verzeichnen. Die Treffsicherheit liegt damit bei 92%. Patient Nr. 40 (Hypernephroides Ca.) liegt mit +10% Hemmung gerade in dem Bereich, wo eine eindeutige Zuordnung wegen der Schwankungsbreite der Messmethode nicht möglich ist. Patient Nr. 41 (Rhabdomyosarkom) ist mit +4% Hemmung eindeutig "falsch negativ". Eine mögliche Ursache ist darin zu sehen, daß bei diesem Patienten die radikale Tumorentfernung 3 Jahre zurückliegt und er als klinisch tumorfrei anzusehen ist. Bei Patient Nr. 42 ist ebenfalls keine Hemmung vorhanden, es handelte sich histologisch um ein relativ ausdifferenziertes Neuroblastom.

Schlussfolgerungen:

1. Dieser Test ist in der Lage in hohem Prozentsatz maligne von nicht-malignen Tumoren zu unterscheiden.
2. Kinetische Untersuchungen ergaben Anhaltspunkte für eine während der ersten 4 Stunden ablaufende Reaktion, die bei Tumorpatienten als Migrationshemmung gemessen wurde und durch eine Mediatorproduktion bedingt sein könnte.
3. Es konnte gezeigt werden, daß das Ausmaß der Migrationshemmung von der Zahl der stimulierten Lymphocyten abhängig ist, und daß eine Verdünnung des Überstandes eines Testansatzes zu einer Abnahme der Migrationshemmung führt.
4. Die Ergebnisse der Versuche, die für eine Mediatorproduktion verantwortlichen Zellen näher zu charakterisieren, lassen vermuten, daß T-Zellen selbst in Gemeinschaft mit autologen Makrophagen nicht alleine für die Migrationshemmung verantwortlich sind.
5. Es fanden sich Hinweise, dass die Gruppe der nicht-rosettenbildenden Lymphocyten möglicherweise den Mediator abgeben.

Herrn Dr. Ch.Tautz, Universitäts-Kinderklinik Tübingen, danke ich für die Überlassung dieses Themas und für die freundliche Unterstützung während der Ausführung.
Für die T-Zell-Anreicherung danke ich der Abteilung für experimentelle Chirurgie und Immunologie in Tübingen (unter der Leitung von Herrn Prof. G. Riethmüller), insbesondere Herrn Dr. J. Saal.

1.BECHT,H.: Properties of erythrocytes stabilized with sulfosalicylic acid and their use in an indirect hämagglutination test with influenza virus RNP-antigen.
J.Immunology 101, 18-22 (1968).

2.BEICKERT,A. und JORKE,D.: Über die erythrostatische Wirkung von Thiocyanat und deren therapeutische Anwendung bei der Polycythämie.
Wiss.Z.Friedrich-Schiller-Univ.Jena, math.naturwiss. Reihe 2, 71-76 (1953).

3.CARNEGIE,P.R., E.A.CASPARY, DICKINSON,J.P. and E.J.FIELD: The macrophage elektrophoretic migration (MEM) test for lymphocyte sensitization. A study of the kinetics.
Clin.exp.Immunol.14, 37-45 (1973 I).

4.CARNEGIE,P.R., E.A.CASPARY, E.J.FIELD: Isolation of an "antigen" from malignant tumours.
Br.J.Cancer 28, Suppl.1, 219-223 (1973).

5.CASPARY,E.A.: Lymphocyte sensitization in malignant neoplasia.
Proc.Roy.Soc.Med. 65, 636-638 (1972).

6.CASPARY,E.A.: The mechanism of antigen-induced electrophoretic mobility reduction of guinea-pig macrophages.
Clin.exp.Immunol.11, 305-309 (1972 I).

7.CASPARY,E.A. and FIELD,E.J.: An encephalitogenic protein of human origin; some chemical and biological properties.
Ann.N.Y.Acad.Sci.122, 182-198 (1965).

8.CASPARY,E.A. and FIELD,E.J.: Specific lymphocyte sensitization in cancer: is there a common antigen in human malignant neoplasia.
Br.Med.J. 2, 613-617 (1971 I).

9.COHNEN,G., AUGENER,W., BUKA,A. and BRITTINGER,G.: Rosette-forming lymphocytes in normals and patients with malignant lymphomas.
Acta Haematol. (Basel) 51 (2), 65-75 (1974).

10.DAVID,J.R.: Macrophage activation induced by lymphocyte mediators.
Acta Endocrinol. (Suppl.) 78(194), 245-261 (1975).

11.DICKINSON,J.P., E.A.CASPARY: The chemical nature of cancer basic protein.
Br.J.Cancer 28, Suppl.1, 224-228 (1973).

12.DICKINSON,J.P., CASPARY,E.A. and FIELD,E.J.: A common tumour specific antigen. I Restriction in-vivo to malignant neoplastic tissue.
Br.J.Cancer 27, 99-105 (1973 II).

13.DUMONDE,D.C. and MAINI,R.N.: The clinical significance of mediators of cellular immunity.
Clin. Allergy, 1 (1), 123-139 (1971).

14.FIELD,E.J. and CASPARY,E.A.: Lymphocyte sensitization: an in-vitro test for cancer?
Lancet 1970 II, 1337-1341.

15.FIELD,E.J., CASPARY,E.A. and CARNEGIE,P.R.: Lymphocyte sensitization to basic protein of brain in malignant neoplasia: experiments with serotonin and related compounds.
Nature London 233, 284-286 (1971 II).

16.FIELD,E.J., CASPARY,E.A. and K.S. SMITH: Macrophage electrophoretic mobility (MEM)-test in cancer: a critical evaluation.
Br.J.Cancer 28, Suppl.1, 208-214 (1973).

17.GOLDSTONE,A.H., KERR,L. and IRVINE,W.J.: The macrophage electrophoretic migration test in cancer.
Clin.exp.Immunol.14, 469-472 (1973).

18.GOLSTEIN,P., WIGZELL,H., BLOMGREN,H. and SVEDMYR,E.A.J.: Cell-mediating specific in-vitro cytotoxicity.
J.exp.Med. 135, 890-906 (1972 I).

19.GROSSMANN,H., HEIDL,C., MÜLLER,M.: Zur Isolierung des Karzinoembryonalen Antigens.
Acta biol.med.germ. 34, 1347-1357 (1975 I).

20.IRMSCHER,J., MÜLLER,M., FISCHER,R., OTTO,G. und STRIETZEL,M.: Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test (MEM) zur immunologischen Diagnose maligner Geschwülste.
Dt.Gesundh.-Wesen 30, H.15 687-692 (1975 I).

21.JENSSEN,H.L. and B.K.SHENTON: Electrophoretic mobility test for lymphocyte sensitization using tanned sheep erythrocytes.
Acta biol.med.germ. 34, K 29-K 32 (1975 I).

22.JÜLICH,W.D., WEUFFEN,W., JENSSEN,H.L. und H.KÖHLER: Beziehungen zwischen den Ergebnissen des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test und dem Rhodanidspiegel bei Patienten mit malignen Tumoren, Autoaggressionskrankheiten und nach Transplantationen.
Acta biol.med.germ. 34, 1541-1547 (1975 I).

23.KWAPINSKI,J.B.G.: Methodology of immunochemical and immunological research.
New York: Wiley-Interscience 1972.

24.LEWKONIA,R.M., KERR,E.J.L. and W.J.IRVINE: Clinical evaluation of the macrophage electrophoretic mobility test for cancer.
Br.J.Cancer 30(6), 532-537 (1974 II).

25.MEYER-RIENECKER,H., JENSSEN,H.L., KÖHLER,H. und GÜNTHER, J.K.: Zur Bedeutung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitätstests für die Diagnostik der Geschwülste des Zentralnervensystems.
Dt.med.Wschr. 100, 538-543 (1975).

26.MEYER-RIENECKER,H., JENSSEN,H.L., KÖHLER,H. GÜNTHER,J. und GUNDLACH,H.J.: Zur Anwendung und Bedeutung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-(MEM)-Testes bei neurologischen Erkrankungen.
Klin.Wschr. 52, 288-292 (1974).

27.MINDERHOUD,J.M. and SMITH,J.K.: Immunological activity of blood lymphocyte fractions. A study by the macrophage elektrophoretic mobility method.
Clin.exp.Immunolog. 10, 571-579 (1972).

28.MÜLLER,M., IRMSCHER,J., FISCHER,R. und GROSSMANN,H.: Immunologisches Tumorprofil. Ein neuartiges Prinzip in der Anwendung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts (MEM)-Test zur differenzierten Karzinomdiagnose.
Dt.Gesundh.-Wesen 30, 1836-1842,H.39 (1975 I).

29.NIND,A.P.P., NAIRN,R.C., ROLLAND,J.M., GULI,E.P.G. and HUGHES,E.S.R.: Lymphocyte anergy in patients with carcinoma.
Br.J.Cancer 28, 108-117 (1973).

30.OPPENHEIM,J.J., G.J.ELFENBEIN and D.L.ROSENSTREICH: The role of macrophages in B-and T-lymphocyte transformation. In:
Mononuclear phagocytes edited by Ralph Vanfurth, Blackwell Scientific Public.,
Oxford London Edinburgh Melbourne, 793-812 (1975).

31.PERPER,R.J., ZEE,T.W. and MICKELSON,M.M.: Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation.
J.Lab.Clin.Med. 72, 842-848 (1968).

32.PICK,E., S.MANHEIMER: The mechanism of action of soluble lymphocytic mediators.
Cellular Immunol. 11, 30-46 (1974).

33.PORZSOLT,F., MÜHLBERGER,G. und AX,W.: Elektrophoretic mobility test (EMT): II. is there a correlation between the clinical diagnosis and immunologic test for precancerous diseases?
Behring Inst.Mitt.No. 57, 137-146 (1975).

34.PORZSOLT,F., TAUTZ,CH. und AX,W.: Elektrophoretic mobility test: I. modifications to simplify the detection of malignant diseases in man.
Behring Inst.Mitt.No. 57, 128-136 (1975).

35.PREECE,A.W. and LIGHT,P.A.: The macrophage elektrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease. Further clinical investigations and studies on macrophage slowing factors.
Clin.exp.Immunol. 18, 543-552 (1974).

36.PRITCHARD,J.A.V., MOORE,J.L., SUTHERLAND, W.H. and JOSLIN,C.A.F.: Evaluation and development of the macrophage elektrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease.
Br.J.Cancer 27, 1-9 (1973).

37. PRITCHARD,J.A.V., MOORE,J.L., SUTHERLAND,W.H. and JOSLIN, C.A.F.: Technical aspects of the macrophage elektrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease.
Br.J.Cancer 28, Suppl.1, 229-236 (1973).

38. RIEBER,E.P., J.G.SAAL, M.HADAM, G. RIETHMÜLLER: Antibody induced tumour cell cytotoxicity mediated by purified human T-lymphocytes. In:
VIIth International Immunopathology Symposium (1976 II), Bad Schachen.
Im Druck.

39. SCHNEIDER,W.: Der Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts (MEM)-Test, eine immunologische Methode zur Diagnose maligner Tumore?
Dissertation Tübingen 1977.

40. SEEGER,R.C. and OPPENHEIM,J.J.: Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes.
J. Exp. Med. 132, 44-65 (1970 I).

41. SEILER,F.R., H.H. SEDLACEK, E.J. KANZY, W.LANG: Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphocyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptor-Rosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Inst. Mitt.No. 52, 26-72 (1972 II).

42. SHENTON, B.K., HUGHES,D. and E.J.FIELD: Macrophage elektrophoretic migration (MEM) test for lymphocyte sensitization: some practical experiences in macrophage selection.
Br. J. Cancer 28, Suppl. 1, 215-218 (1973).

43. WEIR,D.M. and D.E.J. SUCKLING: Macrophage migration inhibition induced by tissue antigen in guinea-pig.
Clin. Exp. Immunol. 8, 791-799 (1971 I).

Lebenslauf

Am 28.5.1949 wurde ich, Engelbert Laier, als Sohn des Direktors Werner Laier und seiner Ehefrau Marie-Thérèse, geb. Jeantet, in Reutlingen geboren.
In Reutlingen besuchte ich die Freie Georgenschule, wo ich am 25.Juni 1969 mein Abitur ablegte. Von Oktober 1969 bis April 1971 absolvierte ich meinen Bundeswehrdienst. Vom Sommersemester 1971 bis zum Sommersemester 1972 studierte ich Biologie in Tübingen.
Im Wintersemester 1972 begann ich in Ulm das vorklinische Medizinstudium, welches ich am 27.August 1974 mit der Ärztlichen Vorprüfung abschloss.
Für das klinische Medizinstudium wechselte ich nach Tübingen über, wo ich am 29.8.1975 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.
Im Februar und September 1975 famulierte ich in einer Landarztpraxis bei Herrn Dr. Riedel in Lichtenstein-Unterhausen.
Im September 1975 heiratete ich meine Frau Dorothea Laier, geb. Luz.
Vom Wintersemester 1975 bis zum Wintersemester 1976 arbeitete ich die hier vorgelegte Dissertation aus.
Am 26.August 1977 absolvierte ich in der Universität Tübingen den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Von Oktober 1977 bis September 1978 führte ich das Praktische Jahr mit den Fachgebieten Gynäkologie, Chirurgie und Innere Medizin in der Universität Tübingen durch.
Am 18.Oktober 1978 bestand ich an der Universität Tübingen den schriftlichen und mündlichen Teil des 3. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.